

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

01.11.2004

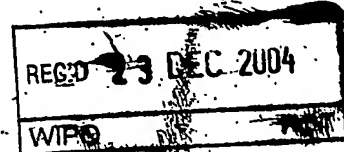
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 3 年 1 1 月 5 日

出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 3 7 5 3 6 3  
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 3 7 5 3 6 3]

出 願 人  
Applicant(s): 鈴木 利治

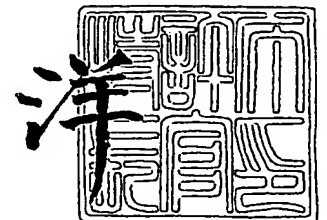


**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 2 月 9 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 P03-074  
【提出日】 平成15年11月 5日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 G01N 33/50  
【発明者】  
    【住所又は居所】 千葉県千葉市中央区春日 1丁目 10番 6号グランヒルズ千葉・春日 703  
    【氏名】 鈴木 利治  
【発明者】  
    【住所又は居所】 北海道札幌市北区北 10条西 2丁目 17-1 コンフォール三貴 905号  
    【氏名】 荒木 陽一  
【発明者】  
    【住所又は居所】 北海道札幌市北区北 13条西 1丁目 2-2 北大式番館 403  
    【氏名】 宮城 尚美  
【発明者】  
    【住所又は居所】 群馬県前橋市下新田町 1022番地 13  
    【氏名】 山口 晴保  
【特許出願人】  
    【識別番号】 501170910  
    【氏名又は名称】 鈴木 利治  
【代理人】  
    【識別番号】 100107870  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 野村 健一  
    【電話番号】 045-290-7480  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100098121  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 間山 世津子  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 126469  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

アルカディン $\alpha$ 、アルカディン $\beta$ 、又はアルカディン $\gamma$  からN末端側の断片とC末端側の断片が切断除去されることによって生成するペプチドであって、アルツハイマー病の診断マーカーとなり得るペプチド。

**【請求項 2】**

切断除去されるN末端側の断片が、N末端側の細胞外ドメインの一部である、請求項 1 記載のペプチド。

**【請求項 3】**

切断除去されるC末端側の断片が、プレセニリンによって切断除去される断片である、請求項 1 又は 2 記載のペプチド。

**【請求項 4】**

動物から採取した体液又は組織における請求項 1 乃至 3 のいずれか一項記載のペプチドの検出又は定量を行う工程を含むアルツハイマー病の診断のためのデータを収集する方法。

**【請求項 5】**

体液が、血液又は脳髄液である、請求項 4 記載のアルツハイマー病の診断のためのデータを収集する方法。

**【請求項 6】**

請求項 1 乃至 3 のいずれか一項記載のペプチドに対する抗体。

**【請求項 7】**

請求項 6 記載の抗体を含有するアルツハイマー病の診断薬。

【書類名】明細書

【発明の名称】アルツハイマー病のマーカーペプチド

【技術分野】

【0001】

本発明は、アルツハイマー病の診断マーカーとなるペプチド、前記ペプチドを用いたアルツハイマー病の診断のためのデータを収集する方法、前記ペプチドに対する抗体、及び前記抗体を含むアルツハイマー病の診断薬に関する。

【背景技術】

【0002】

現在、アルツハイマー病の診断は、専門医による問診や脳の萎縮状態をMRI等によって観察することなどにより行われている。しかし、問診のみによる診断では客観的かつ正確な診断結果を得るのは困難であり、発症前のいわゆる患者予備群の発見は不可能である。また、MRI等の機器は高価であるため、大規模な専門病院でなければ使用することができない。

【0003】

このような現状から、簡易かつ客観的な診断方法として、マーカー物質を用いた生化学的な診断方法が注目されている。現在、アルツハイマー病のマーカー物質としては、主なものとして、細胞内タウタンパク質と $\beta$ -アミロイド（以下、「 $A\beta$ 」という）が知られている（非特許文献1、非特許文献2）。

【0004】

タウタンパク質は神経細胞中の微小管を構成するタンパク質であり、アルツハイマー病の発症により神経細胞が破壊されると細胞外に漏出し、脳脊髄液中に検出されるようになる。タウタンパク質は有用なマーカー物質の一つではあるが、病状が進行しないと検出されず、また、漏出する量が少ないため脳脊髄液以外の体液（例えば、血液）では測定が困難である。

【0005】

$A\beta$ は、アルツハイマー病発症の原因物質であるため、もし、この生成量を正確に測定できれば最も有効なマーカー物質となり得る。しかし、 $A\beta$ は凝集性があるため、その生成量を測定することが困難であり、このため患者脳脊髄液ではむしろ減少した値を示している。

【非特許文献1】 “Decreased beta-amyloid 1-42 and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease” ; Sunderland, T., Linker, G., Mirza, N, Putnam, K.T., Friedman, D. L., Kimmel, L. H., Bergeson, J., Manetti, G. J., Zimmermann, M., Tang, B., Bartko, J. J. and Cohen, R. M. JAMA[2003] 289, 2094-2103.

【非特許文献2】 “Cerebrospinal fluid biomarkers for disease stage and intensity in cognitively impaired patients” : Wahlund, L. O., and Blennow, K. Neurosci. Lett. [2003] 339, 99-102.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

以上のように、現在知られているマーカー物質による診断方法では、アルツハイマー病を初期段階で発見することが難しく、また、血液検査のような被検者に負担の少ない方法で診断することも困難である。

【0007】

本発明は、上記のような技術的背景の下になされたものであり、簡易かつ正確にアルツハイマー病を診断する手段を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意検討を重ねた結果、アルカディン (Alcadein

)というタンパク質が、 $A\beta$ の前駆体(以下、「APP」という)を切断する酵素と同じ酵素によって切断され、 $A\beta$ と同様に細胞外へ分泌されることを見出した。アルカディンが、X11L及びAPPと三者複合体を形成し、その複合体の形成が $A\beta$ の生成を抑制することは既に報告されていたが(Araki, Y. et al., (2003) J. Biol. Chem. in press、特開平2003-164298号公報)、APPと同じ酵素によって切断され、 $A\beta$ と同じようにペプチドが細胞外へ分泌されるということは全く新しい知見である。

#### 【0009】

本発明は、以上の知見の基づき完成されたものである。

#### 【0010】

即ち、本発明は、以下の(1)～(7)を提供するものである。

(1) アルカディン $\alpha$ 、アルカディン $\beta$ 、又はアルカディン $\gamma$ からN末端側の断片とC末端側の断片が切断除去されることによって生成するペプチドであって、アルツハイマー病の診断マーカーとなり得るペプチド(以下、このペプチドを単に「本発明のペプチド」という場合がある。)

(2) 切断除去されるN末端側の断片が、N末端側の細胞外ドメインの一部である、(1)記載のペプチド。

(3) 切断除去されるC末端側の断片が、プレセニリン(もしくはプレセニリンを含む $\gamma$ -セクレターゼ複合体)によって切断除去される断片である、(1)又は(2)記載のペプチド。

(4) 動物から採取した体液又は組織における(1)乃至(3)のいずれか記載のペプチドの検出又は定量を行う工程を含むアルツハイマー病の診断のためのデータを収集する方法。

(5) 体液が、血液又は脳髄液である、(4)記載のアルツハイマー病の診断のためのデータを収集する方法。

(6) (1)乃至(3)のいずれか記載のペプチドに対する抗体(以下、この抗体を「本発明の抗体」という場合がある。)

(7) (6)記載の抗体を含有するアルツハイマー病の診断薬。

#### 【0011】

以下、本発明を詳細に説明する。

#### 【0012】

本発明のペプチドは、アルカディン $\alpha$ 、アルカディン $\beta$ 、又はアルカディン $\gamma$ からN末端側の断片とC末端側の断片が切断除去されることによって生成するペプチドであって、アルツハイマー病の診断マーカーとなり得るペプチドである。

#### 【0013】

アルカディンには、アルカディン $\alpha$ (以下、「Alc $\alpha$ 」という)、アルカディン $\beta$ (以下、「Alc $\beta$ 」という)、アルカディン $\gamma$ (以下、「Alc $\gamma$ 」という)の3種類があり、Alc $\alpha$ とは、配列番号1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質であり、Alc $\beta$ とは、配列番号2で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質であり、Alc $\gamma$ とは、配列番号3で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質である。

#### 【0014】

Alc $\alpha$ 、Alc $\beta$ 、Alc $\gamma$ は、ヒトや温血動物(例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)の細胞(例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、脾臓 $\beta$ 細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など)もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、

脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などに由来するタンパク質であってもよく、合成タンパク質であってもよい。

#### 【0015】

配列番号1、配列番号2、又は配列番号3で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、各配列番号で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約60%以上、さらに好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。各配列番号で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、各配列番号で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、各配列番号で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

#### 【0016】

実質的に同質の活性としては、X11LのPIドメインとの結合活性などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの性質が性質的に（例、生理学的に、または薬理学的に）同質であることを示す。したがって、上記の活性が同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.1～10倍、より好ましくは0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

#### 【0017】

また、Alc $\alpha$ 、Alc $\beta$ 、又はAlc $\gamma$ としては、例えば、（イ）各配列番号で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、（ロ）各配列番号で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、（ハ）各配列番号で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、（ニ）各配列番号で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または（ホ）それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテイン（mutein）も含まれる。上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、活性が消失しない限り、特に限定されない。具体的には、アルカディン $\alpha$ には、配列番号1で表されるアミノ酸配列を有するアルカディン $\alpha$  1と配列番号1で表されるアミノ酸配列の第71番目と72番目に10アミノ酸が挿入されたアルカディン $\alpha$  2が存在する。

#### 【0018】

N末端側の断片が切断除去される部位は、生成するペプチドがアルツハイマー病の診断マーカーとなり得る部位であれば特に制限はないが、N末端側の細胞外ドメイン中の部位であることが好ましい。このような部位は、Alc $\alpha$ の場合、通常、配列番号1で表されるアミノ酸配列の815番目に対応するアミノ酸と816番目に対応するアミノ酸の間又はその近傍であり、Alc $\beta$ の場合、通常、配列番号2で表されるアミノ酸配列の825番目に対応するアミノ酸と826番目に対応するアミノ酸の間又はその近傍であり、Alc $\gamma$ の場合、通常、配列番号3で表されるアミノ酸配列の804番目に対応するアミノ酸と805番目に対応するアミノ酸の間又はその近傍である。

#### 【0019】

さらに、アルカディンはAPPと同様に、N末端側の断片が切断除去される部位は、もう一箇所存在する。Alc $\alpha$ はAPPの $\beta$ -サイトでの切断を行うBACEによっても細胞外で切断される。このような部位は、通常、配列番号1で表されるアミノ酸配列の708番目に対応する

アミノ酸と709番目に対応するアミノ酸の間またはその近傍である。

#### 【0020】

C末端側の断片が切断除去される部位も生成するペプチドがアルツハイマー病の診断マーカーとなり得る部位であれば特に制限はないが、プレセニリンによって切断される部位が好ましい。このような部位は、Alc $\alpha$ の場合、通常、配列番号1で表されるアミノ酸配列の864番目に対応するアミノ酸と865番目に対応するアミノ酸の間もしくはその近傍、または配列番号1で表されるアミノ酸配列の866番目に対応するアミノ酸と867番目に対応するアミノ酸の間その近傍、又は配列番号1で表されるアミノ酸配列の869番目に対応するアミノ酸と870番目に対応するアミノ酸の間もしくはその近傍であり、Alc $\beta$ の場合、通常、配列番号2で表されるアミノ酸配列の875番目に対応するアミノ酸と876番目に対応するアミノ酸の間又はその近傍であり、Alc $\gamma$ の場合、通常、配列番号3で表されるアミノ酸配列の847番目に対応するアミノ酸と848番目に対応するアミノ酸の間又はその近傍である。なお、ここで「近傍」とは、切断部位から通常10個以内のアミノ酸の範囲をいい、好ましくは5個以内のアミノ酸の範囲をいう。

#### 【0021】

本発明のペプチドは、以下の理由から、アルツハイマー病の診断マーカーとして利用することができると考えられる。

(1) 本発明のペプチドはアルカディンから生成するが、アルカディンは、APP及びXL11の三者で複合体を形成する (Araki, Y. et al., (2003) J. Biol. Chem. in press、特開平2003-164298号公報)。また、アルカディンは、アルツハイマー病患者の脳でAPPと同じ分布を示す (実施例2及び3)。

(2) アルカディンはAPPと同じくBACEによって切断される (実施例8)。

(3) 本発明のペプチドは、A $\beta$ と同じくプレセニリンによって切断されることによって生じる (実施例4、6、及び7)。また、本発明のペプチドは、A $\beta$ と同様に細胞外に分泌される (実施例7)。これらの事実から、本発明のペプチドの産生量からA $\beta$ の産生量を予測することが可能であると考えられる。

(4) A $\beta$ は凝集性を持つため、アルツハイマー病の診断マーカーとして定量的に利用できない。N末端側に $\alpha$ -ヘリックス構造、C末端側に $\beta$ -シート構造を持つA $\beta$ は、中央部の26番目のアミノ酸から29番目のアミノ酸からなる配列が $\beta$ -ターン構造を取るため、N-末とC-末が逆平行 $\beta$ -シート構造を作る。これが引き金となってA $\beta$ の凝集を引き起こすと理解されている ("Oligomerization and fibril assembly of the amyloid  $\beta$ -protein" by Roher, A. E et al., Biochem. Biophys. Act. [2000] 1502, 31-43.)。一方、本発明のペプチドは、N末端側に $\alpha$ -ヘリックス構造、C末端側に $\beta$ -シート構造を取り、基本構造はA $\beta$ と同じであるが、 $\beta$ -ターン構造をとる配列はないため、 $\alpha$ -ヘリックスが $\beta$ -シート構造に変換されることがないと予想できるため、凝集性を示さないと考えられる。

#### 【0022】

本発明のペプチドをアルツハイマー病の診断マーカーとして利用し、アルツハイマー病の診断のためのデータを収集することができる。具体的には、動物から採取した体液又は組織における本発明のペプチドの検出又は定量を行うことにより診断データを収集できる。

#### 【0023】

対象とする動物としては、ヒトを挙げることができるが、ヒト以外の温血動物、例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなどを対象としてもよい。

#### 【0024】

体液及び組織としては、血液、血漿、血清、脳髄液、脳組織などを例示でき、これらの中でも血液、脳髄液が好適である。

#### 【0025】

ペプチドの検出又は定量を行う方法は特に限定されないが、抗体を用いる方法、例えば、ウエスタンブロット、ドットブロット、ELISA、サンドイッチELISA、ラジオイムノアッ

セイ、免疫沈降法、などが好ましく、これらの中でもサンドイッチELISAが最も好ましい。サンドイッチELISAは、例えば、Tomitaらの論文("Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein (APP) by secretases occurs after O-glycosylation of APP in the protein secretory pathway" Tomita, S., Kirino, Y., and Suzuki, T. [1998] J. Biol. Chem. 273, 6277-6284)に記載された方法に従って行うことができる。具体的には、(1)本発明のペプチドに対する特異的な抗体を固相に結合させ、(2)そこに試料溶液を加え、(3)固相を洗浄し、(4)本発明のペプチドに対する別の特異的な抗体を加え、(5)前記抗体に対する抗体(抗IgG抗体)であって、酵素で標識されている抗体を加え、(6)前記酵素に対する基質を加え、発色等を指標として、試料溶液中の本発明のペプチドの検出又は定量を行うことができる。ここで、本発明のペプチドに対する特異的な抗体は、後述する方法によって作製することができる。抗IgG抗体は、市販のものを使用することができる。固相としては、マイクロタイターウェル、ラテックス粒子などを使用でき、標識酵素としては、西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼなどを使用できる。

#### 【0026】

本発明の抗体には、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体のいずれも含まれる。

#### 【0027】

モノクローナル抗体は、例えば、前述のTomitaらの文献に記載されている方法に従って作製することができる。具体的には、(1)本発明のペプチドを動物に投与し、(2)前記動物から抗体産生細胞を採取し、(3)前記抗体産生細胞と骨髓腫細胞を融合させ、ハイブリドーマを作製し、(4)前記ハイブリドーマの中から本発明の抗体を産生するハイブリドーマを選択し、(5)前記抗体産生ハイブリドーマの培養上清から抗体を分離精製することにより、目的のモノクローナル抗体を得ることができる。

#### 【0028】

動物に投与する本発明のペプチドは、ペプチド全体でもよいが、その一部分であってもよい。投与する部分ペプチドは特に限定されないが、Alc $\alpha$ 由来のペプチドの場合、配列番号1で表されるアミノ酸配列の816番目から835番目に相当するアミノ酸からなるペプチドが好ましく、Alc $\beta$ 由来のペプチドの場合、配列番号2で表されるアミノ酸配列の826番目から845番目に相当するアミノ酸からなるペプチドが好ましく、Alc $\gamma$ 由来のペプチドの場合、配列番号3で表されるアミノ酸配列の805番目から824番目に相当するアミノ酸からなるペプチドが好ましい。また、ペプチドは、抗体産生能を高めるために完全又は不完全フロイントアジュバントと共に投与してもよい。投与対象とする動物は特に限定されず、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリなどを用いることができる。ペプチドの投与間隔及び回数は特に限定されないが、通常、2～6週ごとに、2～10回程度投与する。抗体産生細胞は、例えば、最終免疫の2～5日後に動物から脾臓又はリンパ節を採取し、それらから得ることができる。使用する骨髓腫細胞は特に限定されず、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1等を使用することができる。細胞融合は、ポリエチレングリコールやセンダイウイルスなどを用いて常法に従って行うことができる。本発明の抗体を産生するハイブリドーマの選択は、例えば、本発明のペプチドを吸着させたマイクロプレート等にハイブリドーマの培養上清を添加し、次いで、酵素等で標識された抗IgG抗体などを添加し、マイクロプレート等に結合した抗IgG抗体を検出することにより行うことができる。ハイブリドーマの培養上清から本発明の抗体の分離は、免疫グロブリンの分離精製に常用される方法、例えば、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法などにより行うことができる。

#### 【0029】

ポリクローナル抗体も、例えば、Arakiらの論文(Araki, Y., et al., [2003] J. Biol. Chem. in press.)などに記載されている方法に従って作製することができる。具体的には、(1)本発明のペプチドを動物に投与し、(2)前記動物から血液、腹水等を採取し、(3)前記血液等から抗体を分離精製することにより、目的のポリクローナル抗体を



得ることができる。ペプチドの投与及び抗体の分離精製は、上記モノクローナル抗体と同様に行うことができる。

#### 【0030】

本発明の診断薬は、通常、上述した本発明の抗体を適当な緩衝液等に添加することにより調製される。抗体の濃度、緩衝液等の種類は特に限定されず、本発明のペプチドを検出又は定量する方法に応じて適宜決められればよい。また、診断薬中には、本発明の抗体以外の成分を含んでもよく、そのような成分としては、酵素標識二次抗体、発色剤などを例示できる。

#### 【発明の効果】

#### 【0031】

本発明のペプチドを利用することにより、被検者に負担のかからない簡易な手段で、アルツハイマー病を発症前または発症初期段階で発見できるようになる。

#### 【発明の実施するための最良の形態】

#### 【0032】

以下、本発明を実施例により更に詳細に説明する。

#### 【実施例】

#### 【0033】

#### 〔実施例1〕

8週令のC57BL6マウス5匹の脳を、氷冷した30mlの緩衝液A(10mM ヘペス pH7.4, 0.32M スクロース, 5 $\mu$ g/ml キモスタチン, 5 $\mu$ g/ml ロイペプチン, 5 $\mu$ g/ml ペプスタチン)中でルーズフィット・テフロン・ホモジナイザー(クリアランス: 0.12 $\mu$ m)で10ストロークすることによりホモジナイズした。このホモジネートを遠心処理(1000xg, 10min)することにより未破壊細胞及び核を除き、除核細胞破砕液を得た。この除核細胞破砕液をさらに遠心処理(100000xg, 60min)して、ペレットとして膜画分を得た。膜画分を2mlの緩衝液Aに加え、再懸濁した。Beckman SW41用チューブの中に、緩衝液A中に0-28%のイオジキサノール密度勾配をかけた溶液(10ml)を入れ、その上に再懸濁した2mlの膜画分を境界面を乱さないように静かに重層した。これを41000rpm, 115min, 4℃で遠心処理した。遠心処理後、チューブの底から900 $\mu$ lづつ13フラクション採取した。各フラクション7.5 $\mu$ lに、5 $\mu$ lの5倍濃度SDS試料緩衝液(43% グリセロール(Wako), 16% SDS(Wako), 64ng/ml プロモフェノールブルー(Wako), 5mM EDTA, 0.22M Tris-HCl pH6.8)及び2.5 $\mu$ lの8M尿素溶液を加え、5分間煮沸した後、8%ゲルを用い、Lammiの方法に従い、SDS-PAGEを行った。ゲル上のタンパク質をニトロセルロースメンブレンに転写し、ウエスタンブロットを行った。検出はECL kit(Pharmacia)を用いて行った。抗体は、抗APP細胞質領域抗体(全長APPとC末端断片を両方検出できる)、抗X11L抗体、抗Alc $\alpha$ 抗体、抗プロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)抗体、抗ゴルジ体130kDaマトリックスタンパク質(GM-130)抗体、抗シナプトタグミン(SYT)抗体、抗マウスキネシン重鎖(KHC)抗体、及び抗プレセニリン1(PS1)C末端断片抗体を用いた。このうち、抗X11L抗体(mint2, BD Biosciences)、抗PDI抗体(1D3, Stressgen Biotechnologies)、抗GM130抗体(#35, BD Biosciences)、抗SYT抗体(#41, BD Biosciences)、抗KHC抗体(H2, CHEMICON International)、及び抗PS1C末端断片抗体(PS1-CTF, CHEMICON International)は市販のものを使用した。抗APP細胞質領域抗体はG369、抗Alc $\alpha$ 抗体はUT83を使用した。G369は、Oishi, M. et al., (1997) Mol. med. 3, 11-113に記載された方法に従って作製されたものである。UT83は、ヒトAlc $\alpha$ 1のC末端ペプチド(954から971のアミノ酸)にCysを加えたペプチドを抗原としたウサギ由来のポリクローナル抗体である(Araki Y., et al. [2003] J. Biol. Chem. in press.)。ウエスタンブロットの結果を図1に示す。

#### 【0034】

ウエスタンブロットの結果、フラクション8にAPP、X11L、Alcが多く含まれていたため、このフラクションから500 $\mu$ l採取し、これを等量の2倍濃度CHAPS緩衝液(20mM CHAPS, 20mM リン酸ナトリウム pH7.4, 280mM 塩化ナトリウム)に加えて、膜成分を可溶化した後、G369(抗APP細胞質領域抗体)で共役免疫沈降を行った。具体的には、可溶化した膜成分

に、G369 4 $\mu$ lを加え、4℃で1時間反応させた後、2倍濃度CHAPS 緩衝液で平衡化した30 $\mu$ lの50%プロテインG-セファロースを加え4℃で1時間反応させた。この反応後のビーズを800 $\mu$ lの2倍濃度CHAPS 緩衝液で洗い、45 $\mu$ lの試料緩衝液混合物(30 $\mu$ lの5倍濃度SDS試料緩衝液と15 $\mu$ lの8M尿素溶液の混合物)を加え、5分間煮沸してビーズに付いている成分を可溶化した。この可溶化成分を8%ゲルでSDS-PAGEを行った後、上記と同様にウエスタンブロットを行った。抗体は、上記で用いた抗APP細胞質領域抗体、抗X11L抗体、抗A $\beta$ 抗体、抗SYT抗体のほか、IgG重鎖 (IgG(H)) に対する抗体も用いた。また、対照として、G369の代わりに等量の非免疫ウサギ血清を用いて共役免疫沈降を行い、それによって得られた成分についてもウエスタンブロットを行った。更に、共役免疫沈降を行う前の可溶化膜成分についても同様にウエスタンブロットを行った。この結果を図2に示す。

#### 【0035】

図2に示すように、G369による共役免疫沈降によって得られた成分の中には、APPだけでなく、X11LやA $\beta$ も含まれていた。このことから、APPは、X11LとA $\beta$ と結合し、三者による複合体を形成すると考えられる。

#### 【0036】

##### 〔実施例2〕

5人のアルツハイマー病患者から採取した前頭葉の組織をKryofix(エタノール、ポリエチレングリコール及び水の混合物、Merck) で1~7日固定後、パラフィンに包埋した。包埋した組織を薄切し、厚さ4 $\mu$ mの連続切片を作製した。切片を脱パラフィン化した後、ABC elite kit(Vector Laboratory)で免疫染色した。

#### 【0037】

免疫染色は、切片を抗A $\beta$ 抗体(UT83)溶液 (0.8 $\mu$ g/ml) 又は抗APP細胞外領域抗体(22C11, Roche Diagnostics)溶液 (0.5 $\mu$ g/ml) でインキュベートし、二次抗体反応後、ペルオキシターゼ活性をジアミノベンジジン-過酸化水素溶液で可視化することにより行った。対照として、免疫していないウサギIgG溶液 (0.8 $\mu$ g/ml) で切片をインキュベートし、同様に免疫染色を行った。また、抗A $\beta$ 抗体と、この抗体に対する抗原ペプチド (40nM) が共存する溶液中で切片をインキュベートし、同様に免疫染色を行った。

#### 【0038】

抗A $\beta$ 抗体、抗APP細胞外領域抗体、及び免疫していないウサギIgGを使用した場合の結果をそれぞれ図3-1、図3-2、図3-3に示す。

#### 【0039】

これらの図に示すように、A $\beta$ とAPPは、アルツハイマー患者の脳内において同じような部位に検出される。なお、抗A $\beta$ 抗体に対する抗原ペプチドを共存させた場合の結果は図に示していないが、図3-3と同様に何も検出されなかった。

#### 【0040】

##### 〔実施例3〕

実施例2で作製した切片を脱パラフィン化した後、抗A $\beta$ 抗体 (0.8 $\mu$ g/ml) と抗APP細胞外領域抗体 (0.5 $\mu$ g/ml) とを含む溶液、又は抗A $\beta$ 抗体 (0.8 $\mu$ g/ml) と抗A $\beta$ 抗体 (1/1000に希釈して使用) とを含む溶液でインキュベートした。抗A $\beta$ 抗体は、4G8 (Signet Lab) を使用した。

#### 【0041】

次に、それぞれの抗体の組み合わせでインキュベートした切片を、ヤギ由来FITC標識抗ウサギIgG抗体 (Jackson immunoresearch lab、1/30に希釈して使用) とヤギ由来Cy3標識抗マウスIgG抗体 (Jackson immunoresearch lab、1/50に希釈して使用) とを含む溶液でインキュベートした。なお、リポフスチン顆粒の自家蛍光は、免疫反応前にスタンブラックB染色により消失処理を行った。

#### 【0042】

一次抗体として抗A $\beta$ 抗体と抗APP細胞外領域抗体を使用した場合の結果を図3-4 (FITCのみを検出)、図3-5 (Cy3のみを検出)、及び図3-6 (FITCとCy3の両者を検出) に示す。また、一次抗体として抗A $\beta$ 抗体と抗A $\beta$ 抗体を使用した場合の結果を図4-

1 (FITCのみを検出)、図4-2 (Cy3のみを検出)、及び図4-3 (FITCとCy3の両者を検出) に示す。

【0043】

図3-4、図3-5、及び図3-6に示すように、 $\text{Alc}\alpha$ とAPPは、アルツハイマー患者の脳内において同じような部位に検出される。この結果は、実施例2の結果とも合致する。また、図4-1、図4-2及び図4-3に示すように、APPは、 $\text{A}\beta$ が蓄積して老人斑が形成されている部位の周辺に検出される。

【0044】

以上の結果から、アルツハイマー病の発症過程で、APPと $\text{Alc}\alpha$ が挙動を同じくしていることが示唆される。

【0045】

〔実施例4〕

$\text{Alc}\alpha$ 、 $\text{Alc}\beta$ 、 $\text{Alc}\gamma$ 、又はAPP695 (695個のアミノ酸からなるヒトAPPのアイソフォーム) をコードするDNAを哺乳類細胞用発現ベクター-pcDNA3.1 (Invitrogen) に挿入した。

【0046】

10%牛胎児血清を含むDMEM (シグマ社D5796) の入った6穴培養皿 (底面積 $10\text{cm}^2$ ) にHEK293細胞を播き、この細胞に上記で作製した発現ベクターを、遺伝子導入試薬 (LipofectA MINE2000, Invitrogen) を用いて導入した。対照として何も挿入していないpcDNA3.1も同様にHEK293細胞に導入した。

【0047】

培地1mlに、プレセニン阻害剤L-685,458 (Calbiochem) のDMSO溶液 (1mM) を $1\mu\text{l}$ 添加し、24時間培養した後、培地を採取した。対照として、L-685,458溶液の代わりに等量のDMSOを添加し、同様に培養を行い、培地を採取した。採取した培地を、1mlのHBST緩衝液 (10mM ヘプス pH7.4, 150mM 塩化ナトリウム, 0.5% TritonX-100,  $5\mu\text{g/ml}$  キモスタチン,  $5\mu\text{g/ml}$  ロイペプチン,  $5\mu\text{g/ml}$  ペプスタチン) 中で細胞中のタンパク質を抽出した。可溶化した細胞を遠心処理 ( $12000\times g$ , 10min) し、上清を集め、可溶化成分を回収した。可溶化成分 $7.5\mu\text{l}$ に対し、 $7.5\mu\text{l}$ の試料緩衝液混合物 ( $5\mu\text{l}$ の5倍濃度SDS試料緩衝液と $2.5\mu\text{l}$ の8M 尿素溶液の混合物) を加え、5分間煮沸した。このサンプルを、8/15%の2段ゲルでSDS-PAGEを行った後、タンパク質をニトロセルロースメンブレンに転写し、ウエスタンブロットを行った。SDS-PAGEはLammlerの常法に従った。一次抗体は、抗APP細胞質領域抗体 (G369, 1/2000に希釈して使用)、抗 $\text{Alc}\alpha$ 抗体 (UT83,  $0.3\mu\text{g/ml}$ )、抗 $\text{Alc}\beta$ 抗体 (UT99,  $0.5\mu\text{g/ml}$ )、及び抗 $\text{Alc}\gamma$ 抗体 (UT105, 1/500に希釈して使用) を用い、検出はECL kit (Pharmacia) を用いて行った。なお、UT99及びUT105はそれぞれ $\text{Alc}\beta$ 及び $\text{Alc}\gamma$ のC末端を認識する抗体である。この結果を図6及び図7A~Cに示す。

【0048】

APPの一回目の切断によって生じるC末端側断片は、プレセニンによって二回目の切断を受け、その切断断片は細胞外に分泌される (図5)。このとき、プレセニン阻害剤を添加すると、二回目の切断は起きず、APPのC末端側断片は細胞内に蓄積する。図6において、プレセニン阻害剤 (L-685,458) を加えた場合にのみC末端側断片 ( $\text{CTF}\alpha$ ) が細胞ライセート中により多く検出されるのはこの事実を反映している。

【0049】

$\text{Alc}\alpha$ 及び $\text{Alc}\gamma$ も、APPと同様に、プレセニン阻害剤を加えた場合にのみ細胞ライセート中にC末端側断片 ( $\text{CTF1}$ ) が検出されている (図7A及びC)。このことから、 $\text{Alc}\alpha$ 及び $\text{Alc}\gamma$ のC末端側断片もAPPのそれと同様にプレセニンによって切断されると考えられる。なお、 $\text{Alc}\beta$ については、プレセニン阻害剤を加えない場合にもC末端側断片が検出されている (図7B)、この実験からは、C末端側断片がプレセニンによって切断されるかどうかはわからない。

【0050】

〔実施例5〕

$\text{Alc}\alpha$ 、 $\text{Alc}\beta$ 、及び $\text{Alc}\gamma$ のN末端シグナル配列の後にFLAGタグ配列が挿入されたタンパ

ク質 (FLAG-Alc $\alpha$ 、FLAG-Alc $\beta$ 、及びFLAG-Alc $\gamma$ ) をコードするDNAを作製し、それらを哺乳類細胞用発現ベクターpcDNA3.1(Invitrogen)に挿入した。

【0051】

10%牛胎児血清を含むDMEM (シグマ社D5796) の入った6穴培養皿 (底面積10cm<sup>2</sup>) にHEK293細胞を播き、この細胞に上記で作製した発現ベクターを、遺伝子導入試薬 (LipofectAMINE2000, Invitrogen) を用いて導入した。対照として何も挿入していないpcDNA3.1も同様にHEK293細胞に導入した。

【0052】

培地1mlに、プレセニン阻害剤L-685,458(Calbiochem)のDMSO溶液 (1mM) を1 $\mu$ l添加し、24時間培養した後、培地を採取した。対照として、L-685,458溶液の代わりに等量のDMSOを添加し、同様に培養を行い、培地を採取した。

【0053】

培地1mlに対して、150 $\mu$ lの緩衝液B (7.7% SDS, 16.7mM Tris-HCl pH7.4, 0.3mg/ml キモスタチン, 0.3mg/ml ロイペプチン, 0.3mg/ml ペプスタチン) を加え、5分間煮沸し、タンパク成分を変性させた。その後、3.75mlの緩衝液C (6.7% NP-40, 0.4M NaCl, 26mM EDTA, 200mM Tris-HCl pH7.4) 、1.75mlの酵素阻害溶液 (10ng/mlロイペプチン, 10ng/ml ペプスタチンA, 10ng/ml キモスタチンを含む蒸留水) を順次加えた後、抗FLAG抗体 (SIGMA社) 2 $\mu$ lを加え、低温室内 (4℃) で8時間チューブを転倒混和し、抗原抗体反応を進行させた。その後、50 $\mu$ lの25% プロテインG-セファロース/25%セファロース-4B (Pharmacia Biotech) を含むリンス緩衝液 (0.1% TritonX-100, 1mM EDTA, 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH7.4) を加え、4℃、3時間回転させた。樹脂成分を遠心処理 (3000rpm, 5min, 4℃) により沈澱させ、回収した。回収した樹脂は非特異的結合を除く目的で、洗浄緩衝液I (0.1% TritonX-100, 1M 塩化ナトリウム, 20mM Tris-HCl pH7.4)、洗浄緩衝液II (0.05% SDS, 1% TritonX-100, 5mM EDTA, 150mM 塩化ナトリウム, 50mM Tris-HCl pH7.4)、リンス緩衝液で、順次洗浄した。その後樹脂に30 $\mu$ lの試料緩衝液混合物 (20 $\mu$ lの5倍濃度SDS試料緩衝液と10 $\mu$ lの8M 尿素溶液の混合物) を加え、攪拌後、5分間煮沸して、樹脂についている成分を可溶化した。遠心後、この上清成分を6%ゲルを用い、SDS-PAGEを行った後、ニトロセルロースメンブレンにタンパク質を転写し、ウエスタンブロットを行った。SDS-PAGEはLammlerの常法に従った。一次抗体は、抗FLAG抗体 (M2, SIGMA) を用い、検出はECL kitを用いて行った。この結果を図7D~Fに示す。

【0054】

これらの図に示すように、Alc $\alpha$ 、Alc $\beta$ 、Alc $\gamma$ のいずれについても、培地中に抗FLAG抗体によって認識される断片が検出された。FLAGタグ配列は成熟Alc $\alpha$ 、Alc $\beta$ 、Alc $\gamma$ のN末端に結合しているため、このことから、Alc $\alpha$ 、Alc $\beta$ 、Alc $\gamma$ の一回目の切断によって生じるN末端側の断片は細胞外に分泌されていると考えられる。

【0055】

〔実施例6〕

Alc $\alpha$ 、Alc $\beta$ 、Alc $\gamma$  をコードするDNAを哺乳類細胞用発現ベクターpcDNA3.1(Invitrogen)に挿入した。

【0056】

10%牛胎児血清を含むDMEMの入った10cm培養皿 (底面積60cm<sup>2</sup>) にHEK293細胞を播き、この細胞に上記で作製した発現ベクターを、遺伝子導入試薬 (LipofectAMINE2000, Invitrogen) を用いて導入した。対照として何も挿入していないpcDNA3.1も同様にHEK293細胞に導入した。

【0057】

24時間培養した後、培地を捨て氷冷PBSにて細胞を洗った。10ml PBSを再度加え、ピペッティングで細胞を剥がし、15ml フアルコンチューブへ入れた。遠心処理 (1500rpm, 10min, ベックマン社製低速冷却遠心機を使用) により細胞を集め、細胞のペレットに対し、1mlの緩衝液D (0.25M スクロース, 10mM トリエタノールアミン-酢酸 pH7.8, 5 $\mu$ g/ml キモスタチン, 5 $\mu$ g/ml ロイペプチン, 5 $\mu$ g/ml ペプスタチン) を加え、27Gの針を12回通

すことにより細胞を破碎した。破碎した細胞はトミー社TMA6 rotarで3000rpm(1000x g) 10min 4℃遠心し、未破壊細胞と核を除き、除核細胞破碎液を得た。この除核細胞破碎液をBeckmann社TLA45 rotarで45000rpm(100000xg) 60min 4℃にて遠心し、上清(細胞質画分)と沈澱(膜画分)を得た。この膜画分を100 $\mu$ lの緩衝液Dに再懸濁した。

#### 【0058】

再懸濁した膜画分から20 $\mu$ lをサンプルとして採取し、37℃で1又は3時間インキュベートした。また、最終濃度1 $\mu$ になるように、プレセニン阻害剤(L-685,458)を添加したサンプルも用意した。各サンプルに20 $\mu$ lの試料緩衝液混合物(13.4 $\mu$ lの5倍濃度SDS試料緩衝液と6.6 $\mu$ lの8M 尿素溶液の混合物)を加えて反応を停止させ、5分間煮沸したのち8/15%の2段ゲルでSDS-PAGEを行った後、ニトロセルロースメンブレンにタンパク質を転写し、ウエスタンブロットを行った。SDS-PAGEはLamlliの常法に従った。一次抗体は、抗Alc $\alpha$ 抗体(UT83)、抗Alc $\beta$ 抗体(UT99)、抗Alc $\gamma$ 抗体(UT105)を用い、検出はECL kit(Pharmacia)を用いて行った。この結果を図8A~Cに示す。

#### 【0059】

これらの図に示すように、Alc $\alpha$ 、Alc $\beta$ 、Alc $\gamma$ のいずれについても、膜画分をインキュベートすることにより、各AlcのC末端領域を含む断片(Alc $\alpha$ -ICD等)が検出された。このような断片はプレセニン阻害剤を加えた場合には検出されなかった。以上のことから、プレセニンによってAlc $\alpha$ 等のC末端領域を含む断片が切り出されると考えられる。

#### 【0060】

##### [実施例7]

Alc $\alpha$ の二回目の切断産物(A $\beta$ 様断片)を効率よく検出するため、Alc $\alpha$   $\Delta$ EをコードするDNAを作製した。図9に示すように、Alc $\alpha$   $\Delta$ Eは、シグナルペプチドと一回目の切断部位(図中の $\delta$ )との間の断片が取り除かれており、また、シグナルペプチドのC末端側には、FLAGタグ配列が挿入されている。

#### 【0061】

Alc $\alpha$   $\Delta$ EをコードするDNAを哺乳類細胞用発現ベクターpcDNA3.1(Invitrogen)に挿入した。10%牛胎児血清を含むDMEMの入った10cm培養皿(底面積60 cm<sup>2</sup>)にHEK293細胞を播き、この細胞に上記で作製した発現ベクターを、遺伝子導入試薬(LipofectAMINE2000, Invitrogen)を用いて導入した。対照として何も挿入していないpcDNA3.1も同様にHEK293細胞に導入した。培地1mlに、10 $\mu$ M LLnL(Calbiochem)、1 $\mu$ M DAPT(Calbiochem)、又は1 $\mu$ M L-685,458(Calbiochem)のDMSO溶液をそれぞれ最終濃度が1 $\mu$ Mになるように添加し(これらはいずれもプレセニン阻害剤である。)、24時間培養した後、培地を採取した。対照として、L-685,458溶液等の代わりに等量のDMSOを添加し、同様に培養を行い、培地を採取した。

#### 【0062】

回収した培地に対し、抗FLAG抗体(M2, SIGMA)による免疫沈降及びウエスタンブロットを行い、プレセニンで切断されるN末端側の産物を検出した。具体的には回収した培地に4 $\mu$ lの抗FLAG抗体を加え4℃で1時間反応させた。その後、30 $\mu$ lの50%プロテインG-セファロースを含むリンス緩衝液(0.1%TrotonX-100, 1mM EDTA, 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH7.4)を加え、さらに4℃で1時間反応させた後、ビーズを回収した。このビーズを、各800 $\mu$ lの洗浄緩衝液I(組成は実施例5に記載)、洗浄緩衝液II(組成は実施例5に記載)、リンス緩衝液(組成は前述)で順次洗った後、30 $\mu$ lの2倍濃度トリシン試料緩衝液(900mM Tris-HCl pH8.45, 24%グリセロール, 8%SDS, 0.005% クマシー・ブリリアント・ブルー)を加え、5分間煮沸し、ビーズに付いている成分を可溶化した。この可溶化成分を15%トリストリシングル(Schagger & von Jagowの定法による)で分離した後、抗FLAG抗体(1/2000に希釈)及び抗Alc $\alpha$ 抗体(UT83)を用いてウエスタンブロットを行い、プレセニンによる切断産物(A $\beta$ 様断片)及びAlc $\alpha$   $\Delta$ EをECL kit(Pharmacia)で検出した。

#### 【0063】

一方、細胞に対しても免疫沈降及びウエスタンブロットを行った。具体的には、細胞を4mlのHBST緩衝液(組成は実施例4に記載)中で細胞中のタンパク質を抽出した。可溶化

した細胞を遠心処理 (12000xg, 10min) し、上清を集め可溶化成分を回収した。可溶化成分 1ml に対し、抗FLAG抗体 2 $\mu$ l を加え 1 時間反応させた後、30 $\mu$ l の 50% プロテインG-セファロースを含む HBST 緩衝液を加え 4 $^{\circ}$ C 1 時間反応させた後、ビーズを回収した。このビーズを 800 $\mu$ l の HBST 緩衝液で 3 回洗った後、45 $\mu$ l の試料緩衝液混合物 (30 $\mu$ l の 5 倍濃度 SDS 試料緩衝液と 15 $\mu$ l の 8M 尿素溶液の混合物) を加え、5 分間煮沸してビーズに付いている成分を可溶化した。この可溶化成分を 15% トリス-グリシンゲル (Lamili の定法にしたがった) で分離した後、抗FLAG抗体 (1/2000 に希釈) 及び抗Alc $\alpha$  抗体 (UT83) を用いてウエスタンブロットを行った。以上の結果を図 10 に示す。

#### 【0064】

図 10 に示すように、遺伝子導入した Alc $\Delta$ E は細胞のライセート中に検出されたが、プレセニンにより切断産物 ( $\beta$ -Alc $\alpha$ ) は培地中においてのみ検出され、細胞のライセート中には検出されなかった。このことから、プレセニンによる切断断片は、A $\beta$  同様、大部分が培地中に放出される性質を持つと考えられる。

#### 【0065】

##### 【実施例 8】

Alc $\alpha$  又は APP695 をコードする DNA を哺乳類細胞用発現ベクター pcDNA3.1 (Invitrogen) に挿入し、また、ヒト BACE1 をコードする DNA (Doms 博士より供与) を哺乳類発現ベクター pcDNA3.1zeo(+) (Invitrogen) に挿入した。

#### 【0066】

10% 牛胎児血清を含む DMEM (シグマ社 D5796) の入った 6 穴培養皿 (底面積 10cm<sup>2</sup>) に HEK293 細胞を播き、この細胞に上記で作製した発現ベクターを、遺伝子導入試薬 (Lipofect AMINE2000, Invitrogen) を用いて導入した。導入した DNA の組み合わせは図 11 の記載の通りである。

#### 【0067】

各細胞を 24 時間培養後、細胞を HBST 緩衝液 (組成は実施例 4 に記載) 中でタンパク質を可溶化し、8/15% ゲルで SDS-PAGE を行った。ゲル上のタンパク質をニトロセルロースメンブレンに転写し、抗APP抗体 (APP/c, SIGMA) 及び抗Alc $\alpha$  抗体 (UT83 抗体) を用いてウエスタンブロットを行った。抗APP抗体を用いた場合及び抗Alc $\alpha$  抗体を用いた場合のウエスタンブロットの結果をそれぞれ図 11 A 及び B に示す。

#### 【0068】

図 11 A に示すように、BACE1 を発現させていない細胞 (左から 3 番目のレーン) では、主に  $\alpha$ -サイトの切断産物である CTF $\alpha$  が検出されたが、BACE1 を発現させた細胞 (左から 4 番目のレーン) では  $\beta$ -サイトの切断産物である CTF $\beta$  も検出された。なお、APP695 に対応するバンドは矢印で示した二本のバンドだけであり、これらの近傍に検出される二本のバンドは内在性の APP (APP770 及び APP751) に対応するものである。

#### 【0069】

図 11 B に示すように、Alc $\alpha$  を発現させ、BACE1 を発現させていない細胞 (左から 5 番目のレーン) では、主に 30kDa の位置に断片 (CTF1) が検出された。この断片の分子量は、実施例 7 で発現させた Alc $\alpha$   $\Delta$ E の分子量とほぼ一致するので、切断サイトは 815 番目の Met と 816 番目の Ala の間付近であり、アミノ酸数は約 156 であると推測される。一方、Alc $\alpha$  と BACE1 の両者を発現させた細胞 (左から 6 番目のレーン) では、CTF1 の他に、この断片よりも分子量の大きい断片が検出された (CTF $\beta$ 、分子量から判断して約 280 アミノ酸からなるものと推測される)。この断片は、Alc $\alpha$  が BACE1 によって切断されたことによって生じたものであると考えられる。即ち、Alc $\alpha$  は、APP と同様に BACE1 によって切断されることが考えられる。なお、図 11 中で Alc $\alpha$  は二本のバンドとして検出されているが、これは糖鎖修飾によるものである。

##### 【図面の簡単な説明】

#### 【0070】

【図 1】 密度勾配遠心によって分けられたタンパク質のウエスタンブロットの結果を示す写真。

【図2】免疫沈降によって回収されたタンパク質のウエスタンブロットの結果を示す写真。

【図3】アルツハイマー病患者の脳切片の免疫染色写真 (A $\beta$  と APP を検出)。

【図4】アルツハイマー病患者の脳切片の免疫染色写真 (A $\beta$  と A $\beta$  を検出)。

【図5】APPからのA $\beta$ 生成を模式的に表した図。

【図6】抗APP抗体を用いた細胞ライセートのウエスタンブロットの結果を示す図。

【図7】抗A $\beta$ 抗体を用いた細胞ライセートと培地のウエスタンブロットの結果を示す図。

【図8】抗A $\beta$ 抗体を用いた膜画分のウエスタンブロットの結果を示す図。

【図9】A $\beta$   $\Delta$ Eの構造を示す図。

【図10】抗FLAG抗体を用いた細胞ライセートと培地のウエスタンブロットの結果を示す図。

【図11】APPまたはA $\beta$  及びBACE1を発現させた細胞のライセートのウエスタンブロットの結果を示す図。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Toshiharu Suzuki

&lt;120&gt; MARKER PEPTIDE FOR ALZHEIMER'S DISEASE

&lt;130&gt; P03-074

&lt;160&gt; 3

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 971

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 1

Met Leu Arg Arg Pro Ala Pro Ala Leu Ala Pro Ala Ala Arg Leu Leu  
 1 5 10 15

Leu Ala Gly Leu Leu Cys Gly Gly Gly Val Trp Ala Ala Arg Val Asn  
 20 25 30

Lys His Lys Pro Trp Leu Glu Pro Thr Tyr His Gly Ile Val Thr Glu  
 35 40 45

Asn Asp Asn Thr Val Leu Leu Asp Pro Pro Leu Ile Ala Leu Asp Lys  
 50 55 60

Asp Ala Pro Leu Arg Phe Ala Gly Glu Ile Cys Gly Phe Lys Ile His  
 65 70 75 80

Gly Gln Asn Val Pro Phe Asp Ala Val Val Val Asp Lys Ser Thr Gly  
 85 90 95

Glu Gly Val Ile Arg Ser Lys Glu Lys Leu Asp Cys Glu Leu Gln Lys  
 100 105 110

Asp Tyr Ser Phe Thr Ile Gln Ala Tyr Asp Cys Gly Lys Gly Pro Asp  
 115 120 125

Gly Thr Asn Val Lys Lys Ser His Lys Ala Thr Val His Ile Gln Val  
 130 135 140

Asn Asp Val Asn Glu Tyr Ala Pro Val Phe Lys Glu Lys Ser Tyr Lys  
 145 150 155 160

Ala Thr Val Ile Glu Gly Lys Gln Tyr Asp Ser Ile Leu Arg Val Glu



	165		170		175
Ala Val Asp	Ala Asp Cys Ser Pro	Gln Phe Ser Gln Ile	Cys Ser Tyr		
	180		185		190
Glu Ile Ile	Thr Pro Asp Val Pro	Phe Thr Val Asp	Lys Asp Gly Tyr		
	195		200		205
Ile Lys Asn	Thr Glu Lys Leu Asn Tyr	Gly Lys Glu His Gln Tyr	Lys		
	210		215		220
Leu Thr Val	Thr Ala Tyr Asp Cys Gly Lys	Lys Arg Ala Thr Glu Asp			
	225		230		235
Val Leu Val	Lys Ile Ser Ile Lys Pro	Thr Cys Thr Pro Gly Trp Gln			
	245		250		255
Gly Trp Asn	Asn Arg Ile Glu Tyr Glu	Pro Gly Thr Gly Ala Leu Ala			
	260		265		270
Val Phe Pro	Asn Ile His Leu Glu Thr Cys Asp	Glu Pro Val Ala Ser			
	275		280		285
Val Gln Ala	Thr Val Glu Leu Glu Thr Ser His	Ile Gly Lys Gly Cys			
	290		295		300
Asp Arg Asp	Thr Tyr Ser Glu Lys Ser Leu His Arg	Leu Cys Gly Ala			
	305		310		315
Ala Ala Gly	Thr Ala Glu Leu Leu Pro Ser Pro Ser	Gly Ser Leu Asn			
	325		330		335
Trp Thr Met	Gly Leu Pro Thr Asp Asn Gly His Asp Ser	Asp Gln Val			
	340		345		350
Phe Glu Phe	Asn Gly Thr Gln Ala Val Arg Ile Pro Asp	Gly Val Val			
	355		360		365
Ser Val Ser	Pro Lys Glu Pro Phe Thr Ile Ser Val Trp Met Arg His				
	370		375		380
Gly Pro Phe	Gly Arg Lys Lys Glu Thr Ile Leu Cys Ser Ser Asp	Lys			
	385		390		395
Thr Asp Met	Asn Arg His His Tyr Ser Leu Tyr Val His Gly Cys Arg				
	405		410		415
Leu Ile Phe	Leu Phe Arg Gln Asp Pro Ser Glu Glu Lys Lys Tyr Arg				
	420		425		430

Pro Ala Glu Phe His Trp Lys Leu Asn Gln Val Cys Asp Glu Glu Trp  
 435 440 445  
 His His Tyr Val Leu Asn Val Glu Phe Pro Ser Val Thr Leu Tyr Val  
 450 455 460  
 Asp Gly Thr Ser His Glu Pro Phe Ser Val Thr Glu Asp Tyr Pro Leu  
 465 470 475 480  
 His Pro Ser Lys Ile Glu Thr Gln Leu Val Val Gly Ala Cys Trp Gln  
 485 490 495  
 Glu Phe Ser Gly Val Glu Asn Asp Asn Glu Thr Glu Pro Val Thr Val  
 500 505 510  
 Ala Ser Ala Gly Gly Asp Leu His Met Thr Gln Phe Phe Arg Gly Asn  
 515 520 525  
 Leu Ala Gly Leu Thr Leu Arg Ser Gly Lys Leu Ala Asp Lys Lys Val  
 530 535 540  
 Ile Asp Cys Leu Tyr Thr Cys Lys Glu Gly Leu Asp Leu Gln Val Leu  
 545 550 555 560  
 Glu Asp Ser Gly Arg Gly Val Gln Ile Gln Ala His Pro Ser Gln Leu  
 565 570 575  
 Val Leu Thr Leu Glu Gly Glu Asp Leu Gly Glu Leu Asp Lys Ala Met  
 580 585 590  
 Gln His Ile Ser Tyr Leu Asn Ser Arg Gln Phe Pro Thr Pro Gly Ile  
 595 600 605  
 Arg Arg Leu Lys Ile Thr Ser Thr Ile Lys Cys Phe Asn Glu Ala Thr  
 610 615 620  
 Cys Ile Ser Val Pro Pro Val Asp Gly Tyr Val Met Val Leu Gln Pro  
 625 630 635 640  
 Glu Glu Pro Lys Ile Ser Leu Ser Gly Val His His Phe Ala Arg Ala  
 645 650 655  
 Ala Ser Glu Phe Glu Ser Ser Glu Gly Val Phe Leu Phe Pro Glu Leu  
 660 665 670  
 Arg Ile Ile Ser Thr Ile Thr Arg Glu Val Glu Pro Glu Gly Asp Gly  
 675 680 685  
 Ala Glu Asp Pro Thr Val Gln Glu Ser Leu Val Ser Glu Glu Ile Val  
 690 695 700

His Asp Leu Asp Thr Cys Glu Val Thr Val Glu Gly Glu Glu Leu Asn  
 705 710 715 720  
 His Glu Gln Glu Ser Leu Glu Val Asp Met Ala Arg Leu Gln Gln Lys  
 725 730 735  
 Gly Ile Glu Val Ser Ser Ser Glu Leu Gly Met Thr Phe Thr Gly Val  
 740 745 750  
 Asp Thr Met Ala Ser Tyr Glu Glu Val Leu His Leu Leu Arg Tyr Arg  
 755 760 765  
 Asn Trp His Ala Arg Ser Leu Leu Asp Arg Lys Phe Lys Leu Ile Cys  
 770 775 780  
 Ser Glu Leu Asn Gly Arg Tyr Ile Ser Asn Glu Phe Lys Val Glu Val  
 785 790 795 800  
 Asn Val Ile His Thr Ala Asn Pro Met Glu His Ala Asn His Met Ala  
 805 810 815  
 Ala Gln Pro Gln Phe Val His Pro Glu His Arg Ser Phe Val Asp Leu  
 820 825 830  
 Ser Gly His Asn Leu Ala Asn Pro His Pro Phe Ala Val Val Pro Ser  
 835 840 845  
 Thr Ala Thr Val Val Ile Val Val Cys Val Ser Phe Leu Val Phe Met  
 850 855 860  
 Ile Ile Leu Gly Val Phe Arg Ile Arg Ala Ala Ser Thr Arg Thr Met  
 865 870 875 880  
 Arg Asp Gln Asp Thr Gly Lys Glu Asn Glu Met Asp Trp Asp Asp Ser  
 885 890 895  
 Ala Leu Thr Ile Thr Val Asn Pro Met Glu Thr Tyr Glu Asp Gln His  
 900 905 910  
 Ser Ser Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Ser Glu Asp  
 915 920 925  
 Gly Glu Glu Glu Asp Asp Ile Thr Ser Ala Glu Ser Glu Ser Ser Glu  
 930 935 940  
 Glu Glu Glu Gly Glu Gln Gly Asp Pro Gln Asn Ala Thr Arg Gln Gln  
 945 950 955 960  
 Gln Leu Glu Trp Asp Asp Ser Thr Leu Ser Tyr

965

970

<210> 2  
 <211> 968  
 <212> PRT  
 <213> human

<400> 2  
 Met Val Leu Gly Cys Glu Leu Ser Gly Ser Thr Arg Val Val Val Gly  
 1 5 10 15  
 Val Glu Ala Leu Leu Thr Gly Ala Ser Ser Pro Leu Pro Gly Val Gly  
 20 25 30  
 Pro Ala Asn Lys His Lys Pro Trp Ile Glu Ala Glu Tyr Gln Gly Ile  
 35 40 45  
 Val Met Glu Asn Asp Asn Thr Val Leu Leu Asn Pro Pro Leu Phe Ala  
 50 55 60  
 Leu Asp Lys Asp Ala Pro Leu Arg Tyr Ala Gly Glu Ile Cys Gly Phe  
 65 70 75 80  
 Arg Leu His Gly Ser Gly Val Pro Phe Glu Ala Val Ile Leu Asp Lys  
 85 90 95  
 Ala Thr Gly Glu Gly Leu Ile Arg Ala Lys Glu Pro Val Asp Cys Glu  
 100 105 110  
 Ala Gln Lys Glu His Thr Phe Thr Ile Gln Ala Tyr Asp Cys Gly Glu  
 115 120 125  
 Gly Pro Asp Gly Ala Asn Thr Lys Lys Ser His Lys Ala Thr Val His  
 130 135 140  
 Val Arg Val Asn Asp Val Asn Glu Phe Ala Pro Val Phe Val Glu Arg  
 145 150 155 160  
 Leu Tyr Arg Ala Ala Val Thr Glu Gly Lys Leu Tyr Asp Arg Ile Leu  
 165 170 175  
 Arg Val Glu Ala Ile Asp Gly Asp Cys Ser Pro Gln Tyr Ser Gln Ile  
 180 185 190  
 Cys Tyr Tyr Glu Ile Leu Thr Pro Asn Thr Pro Phe Leu Ile Asp Asn  
 195 200 205  
 Asp Gly Asn Ile Glu Asn Thr Glu Lys Leu Gln Tyr Ser Gly Glu Arg  
 210 215 220

Leu Tyr Lys Phe Thr Val Thr Ala Tyr Asp Cys Gly Lys Lys Arg Ala  
225 230 235 240

Ala Asp Asp Ala Glu Val Glu Ile Gln Val Lys Pro Thr Cys Lys Pro  
245 250 255

Ser Trp Gln Gly Trp Asn Lys Arg Ile Glu Tyr Ala Pro Gly Ala Gly  
260 265 270

Ser Leu Ala Leu Phe Pro Gly Ile Arg Leu Glu Thr Cys Asp Glu Pro  
275 280 285

Leu Trp Asn Ile Gln Ala Thr Ile Glu Leu Gln Thr Ser His Val Ala  
290 295 300

Lys Gly Cys Asp Arg Asp Asn Tyr Ser Glu Arg Ala Leu Arg Lys Leu  
305 310 315 320

Cys Gly Ala Ala Thr Gly Glu Val Asp Leu Leu Pro Met Pro Gly Pro  
325 330 335

Asn Ala Asn Trp Thr Ala Gly Leu Ser Val His Tyr Ser Gln Asp Ser  
340 345 350

Ser Leu Ile Tyr Trp Phe Asn Gly Thr Gln Ala Val Gln Val Pro Leu  
355 360 365

Gly Gly Pro Ser Gly Leu Gly Ser Gly Pro Gln Asp Ser Leu Ser Asp  
370 375 380

His Phe Thr Leu Ser Phe Trp Met Lys His Gly Val Thr Pro Asn Lys  
385 390 395 400

Gly Lys Lys Glu Glu Glu Thr Ile Val Cys Asn Thr Val Gln Asn Glu  
405 410 415

Asp Gly Phe Ser His Tyr Ser Leu Thr Val His Gly Cys Arg Ile Ala  
420 425 430

Phe Leu Tyr Trp Pro Leu Leu Glu Ser Ala Arg Pro Val Lys Phe Leu  
435 440 445

Trp Lys Leu Glu Gln Val Cys Asp Asp Glu Trp His His Tyr Ala Leu  
450 455 460

Asn Leu Glu Phe Pro Thr Val Thr Leu Tyr Thr Asp Gly Ile Ser Phe  
465 470 475 480

Asp Pro Ala Leu Ile His Asp Asn Gly Leu Ile His Pro Pro Arg Arg  
485 490 495

Glu Pro Ala Leu Met Ile Gly Ala Cys Trp Thr Glu Glu Lys Asn Lys  
500 505 510

Glu Lys Glu Lys Gly Asp Asn Ser Thr Asp Thr Thr Gln Gly Asp Pro  
515 520 525

Leu Ser Ile His His Tyr Phe His Gly Tyr Leu Ala Gly Phe Ser Val  
530 535 540

Arg Ser Gly Arg Leu Glu Ser Arg Glu Val Ile Glu Cys Leu Tyr Ala  
545 550 555 560

Cys Arg Glu Gly Leu Asp Tyr Arg Asp Phe Glu Ser Leu Gly Lys Gly  
565 570 575

Met Lys Val His Val Asn Pro Ser Gln Ser Leu Leu Thr Leu Glu Gly  
580 585 590

Asp Asp Val Glu Thr Phe Asn His Ala Leu Gln His Val Ala Tyr Met  
595 600 605

Asn Thr Leu Arg Phe Ala Thr Pro Gly Val Arg Pro Leu Arg Leu Thr  
610 615 620

Thr Ala Val Lys Cys Phe Ser Glu Glu Ser Cys Val Ser Ile Pro Glu  
625 630 635 640

Val Glu Gly Tyr Val Val Val Leu Gln Pro Asp Ala Pro Gln Ile Leu  
645 650 655

Leu Ser Gly Thr Ala His Phe Ala Arg Pro Ala Val Asp Phe Glu Gly  
660 665 670

Thr Asn Gly Val Pro Leu Phe Pro Asp Leu Gln Ile Thr Cys Ser Ile  
675 680 685

Ser His Gln Val Glu Ala Lys Lys Asp Glu Ser Trp Gln Gly Thr Val  
690 695 700

Thr Asp Thr Arg Met Ser Asp Glu Ile Val His Asn Leu Asp Gly Cys  
705 710 715 720

Glu Ile Ser Leu Val Gly Asp Asp Leu Asp Pro Glu Arg Glu Ser Leu  
725 730 735

Leu Leu Asp Thr Thr Ser Leu Gln Gln Arg Gly Leu Glu Leu Thr Asn  
740 745 750

Thr Ser Ala Tyr Leu Thr Ile Ala Gly Val Glu Ser Ile Thr Val Tyr

755					760					765									
Glu	Glu	Ile	Leu	Arg	Gln	Ala	Arg	Tyr	Arg	Leu	Arg	His	Gly	Ala	Ala				
770					775					780									
Leu	Tyr	Thr	Arg	Lys	Phe	Arg	Leu	Ser	Cys	Ser	Glu	Met	Asn	Gly	Arg				
785					790					795					800				
Tyr	Ser	Ser	Asn	Glu	Phe	Ile	Val	Glu	Val	Asn	Val	Leu	His	Ser	Met				
805					810					815									
Asn	Arg	Val	Ala	His	Pro	Ser	His	Val	Leu	Ser	Ser	Gln	Gln	Phe	Leu				
820					825					830									
His	Arg	Gly	His	Gln	Pro	Pro	Pro	Glu	Met	Ala	Gly	His	Ser	Leu	Ala				
835					840					845									
Ser	Ser	His	Arg	Asn	Ser	Met	Ile	Pro	Ser	Ala	Ala	Thr	Leu	Ile	Ile				
850					855					860									
Val	Val	Cys	Val	Gly	Phe	Leu	Val	Leu	Met	Val	Val	Leu	Gly	Leu	Val				
865					870					875					880				
Arg	Ile	His	Ser	Leu	His	Arg	Arg	Val	Ser	Gly	Ala	Gly	Gly	Pro	Pro				
885					890					895									
Gly	Ala	Ser	Ser	Asp	Pro	Lys	Asp	Pro	Asp	Leu	Phe	Trp	Asp	Asp	Ser				
900					905					910									
Ala	Leu	Thr	Ile	Ile	Val	Asn	Pro	Met	Glu	Ser	Tyr	Gln	Asn	Arg	Gln				
915					920					925									
Ser	Cys	Val	Thr	Gly	Ala	Val	Gly	Gly	Gln	Gln	Glu	Asp	Glu	Asp	Ser				
930					935					940									
Ser	Asp	Ser	Glu	Val	Ala	Asp	Ser	Pro	Ser	Ser	Asp	Glu	Arg	Arg	Ile				
945					950					955					960				
Ile	Glu	Thr	Pro	Pro	His	Arg	Tyr												
965																			

<210> 3  
 <211> 955  
 <212> PRT  
 <213> human

<400> 3  
 Met Leu Pro Gly Arg Leu Cys Trp Val Pro Leu Leu Leu Ala Leu Gly  
 1 5 10 15

Val Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Asp Ser Arg Gln Arg Arg Leu  
 20 25 30  
 Leu Ala Ala Lys Val Asn Lys His Lys Pro Trp Ile Glu Thr Ser Tyr  
 35 40 45  
 His Gly Val Ile Thr Glu Asn Asn Asp Thr Val Ile Leu Asp Pro Pro  
 50 55 60  
 Leu Val Ala Leu Asp Lys Asp Ala Pro Val Pro Phe Ala Gly Glu Ile  
 65 70 75 80  
 Cys Ala Phe Lys Ile His Gly Gln Glu Leu Pro Phe Glu Ala Val Val  
 85 90 95  
 Leu Asn Lys Thr Ser Gly Glu Gly Arg Leu Arg Ala Lys Ser Pro Ile  
 100 105 110  
 Asp Cys Glu Leu Gln Lys Glu Tyr Thr Phe Ile Ile Gln Ala Tyr Asp  
 115 120 125  
 Cys Gly Ala Gly Pro His Glu Thr Ala Trp Lys Lys Ser His Lys Ala  
 130 135 140  
 Val Val His Ile Gln Val Lys Asp Val Asn Glu Phe Ala Pro Thr Phe  
 145 150 155 160  
 Lys Glu Pro Ala Tyr Lys Ala Val Val Thr Glu Gly Lys Ile Tyr Asp  
 165 170 175  
 Ser Ile Leu Gln Val Glu Ala Ile Asp Glu Asp Cys Ser Pro Gln Tyr  
 180 185 190  
 Ser Gln Ile Cys Asn Tyr Glu Ile Val Thr Thr Asp Val Pro Phe Ala  
 195 200 205  
 Ile Asp Arg Asn Gly Asn Ile Arg Asn Thr Glu Lys Leu Ser Tyr Asp  
 210 215 220  
 Lys Gln His Gln Tyr Glu Ile Leu Val Thr Ala Tyr Asp Cys Gly Gln  
 225 230 235 240  
 Lys Pro Ala Ala Gln Asp Thr Leu Val Gln Val Asp Val Lys Pro Val  
 245 250 255  
 Cys Lys Pro Gly Trp Gln Asp Trp Thr Lys Arg Ile Glu Tyr Gln Pro  
 260 265 270  
 Gly Ser Gly Ser Met Pro Leu Phe Pro Ser Ile His Leu Glu Thr Cys  
 275 280 285



Asp Gly Ala Val Ser Ser Leu Gln Ile Val Thr Glu Leu Gln Thr Asn  
290 295 300

Tyr Ile Gly Lys Gly Cys Asp Arg Glu Thr Tyr Ser Glu Lys Ser Leu  
305 310 315 320

Gln Lys Leu Cys Gly Ala Ser Ser Gly Ile Ile Asp Leu Leu Pro Ser  
325 330 335

Pro Ser Ala Ala Thr Asn Trp Thr Ala Gly Leu Leu Val Asp Ser Ser  
340 345 350

Glu Met Ile Phe Lys Phe Asp Gly Arg Gln Gly Ala Lys Ile Pro Asp  
355 360 365

Gly Ile Val Pro Lys Asn Leu Thr Asp Gln Phe Thr Ile Thr Met Trp  
370 375 380

Met Lys His Gly Pro Ser Pro Gly Val Arg Ala Glu Lys Glu Thr Ile  
385 390 395 400

Leu Cys Asn Ser Asp Lys Thr Glu Met Asn Arg His His Tyr Ala Leu  
405 410 415

Tyr Val His Asn Cys Arg Leu Val Phe Leu Leu Arg Lys Asp Phe Asp  
420 425 430

Gln Ala Asp Thr Phe Arg Pro Ala Glu Phe His Trp Lys Leu Asp Gln  
435 440 445

Ile Cys Asp Lys Glu Trp His Tyr Tyr Val Ile Asn Val Glu Phe Pro  
450 455 460

Val Val Thr Leu Tyr Met Asp Gly Ala Thr Tyr Glu Pro Tyr Leu Val  
465 470 475 480

Thr Asn Asp Trp Pro Ile His Pro Ser His Ile Ala Met Gln Leu Thr  
485 490 495

Val Gly Ala Cys Trp Gln Gly Gly Glu Val Thr Lys Pro Gln Phe Ala  
500 505 510

Gln Phe Phe His Gly Ser Leu Ala Ser Leu Thr Ile Arg Pro Gly Lys  
515 520 525

Met Glu Ser Gln Lys Val Ile Ser Cys Leu Gln Ala Cys Lys Glu Gly  
530 535 540

Leu Asp Ile Asn Ser Leu Glu Ser Leu Gly Gln Gly Ile Lys Tyr His

545                      550                      555                      560  
 Phe Asn Pro Ser Gln Ser Ile Leu Val Met Glu Gly Asp Asp Ile Gly  
                                  565                                   570                                   575  
 Asn Ile Asn Arg Ala Leu Gln Lys Val Ser Tyr Ile Asn Ser Arg Gln  
                                  580                                   585                                   590  
 Phe Pro Thr Ala Gly Val Arg Arg Leu Lys Val Ser Ser Lys Val Gln  
                                  595                                   600                                   605  
 Cys Phe Gly Glu Asp Val Cys Ile Ser Ile Pro Glu Val Asp Ala Tyr  
                                  610                                   615                                   620  
 Val Met Val Leu Gln Ala Ile Glu Pro Arg Ile Thr Leu Arg Gly Thr  
 625                                   630                                   635                                   640  
 Asp His Phe Trp Arg Pro Ala Ala Gln Phe Glu Ser Ala Arg Gly Val  
                                  645                                   650                                   655  
 Thr Leu Phe Pro Asp Ile Lys Ile Val Ser Thr Phe Ala Lys Thr Glu  
                                  660                                   665                                   670  
 Ala Pro Gly Asp Val Lys Thr Thr Asp Pro Lys Ser Glu Val Leu Glu  
                                  675                                   680                                   685  
 Glu Met Leu His Asn Leu Asp Phe Cys Asp Ile Leu Val Ile Gly Gly  
                                  690                                   695                                   700  
 Asp Leu Asp Pro Arg Gln Glu Cys Leu Glu Leu Asn His Ser Glu Leu  
 705                                   710                                   715                                   720  
 His Gln Arg His Leu Asp Ala Thr Asn Ser Thr Ala Gly Tyr Ser Ile  
                                  725                                   730                                   735  
 Tyr Gly Val Gly Ser Met Ser Arg Tyr Glu Gln Val Leu His His Ile  
                                  740                                   745                                   750  
 Arg Tyr Arg Asn Trp Arg Pro Ala Ser Leu Glu Ala Arg Arg Phe Arg  
                                  755                                   760                                   765  
 Ile Lys Cys Ser Glu Leu Asn Gly Arg Tyr Thr Ser Asn Glu Phe Asn  
                                  770                                   775                                   780  
 Leu Glu Val Ser Ile Leu His Glu Asp Gln Val Ser Asp Lys Glu His  
 785                                   790                                   795                                   800  
 Val Asn His Leu Ile Val Gln Pro Pro Phe Leu Gln Ser Val His His  
                                  805                                   810                                   815

Pro Glu Ser Arg Ser Ser Ile Gln His Ser Ser Val Val Pro Ser Ile  
820 825 830

Ala Thr Val Val Ile Ile Ile Ser Val Cys Met Leu Val Phe Val Val  
835 840 845

Ala Met Gly Val Tyr Arg Val Arg Ile Ala His Gln His Phe Ile Gln  
850 855 860

Glu Thr Glu Ala Ala Lys Glu Ser Glu Met Asp Trp Asp Asp Ser Ala  
865 870 875 880

Leu Thr Ile Thr Val Asn Pro Met Glu Lys His Glu Gly Pro Gly His  
885 890 895

Gly Glu Asp Glu Thr Glu Gly Glu Glu Glu Glu Ala Glu Glu Glu  
900 905 910

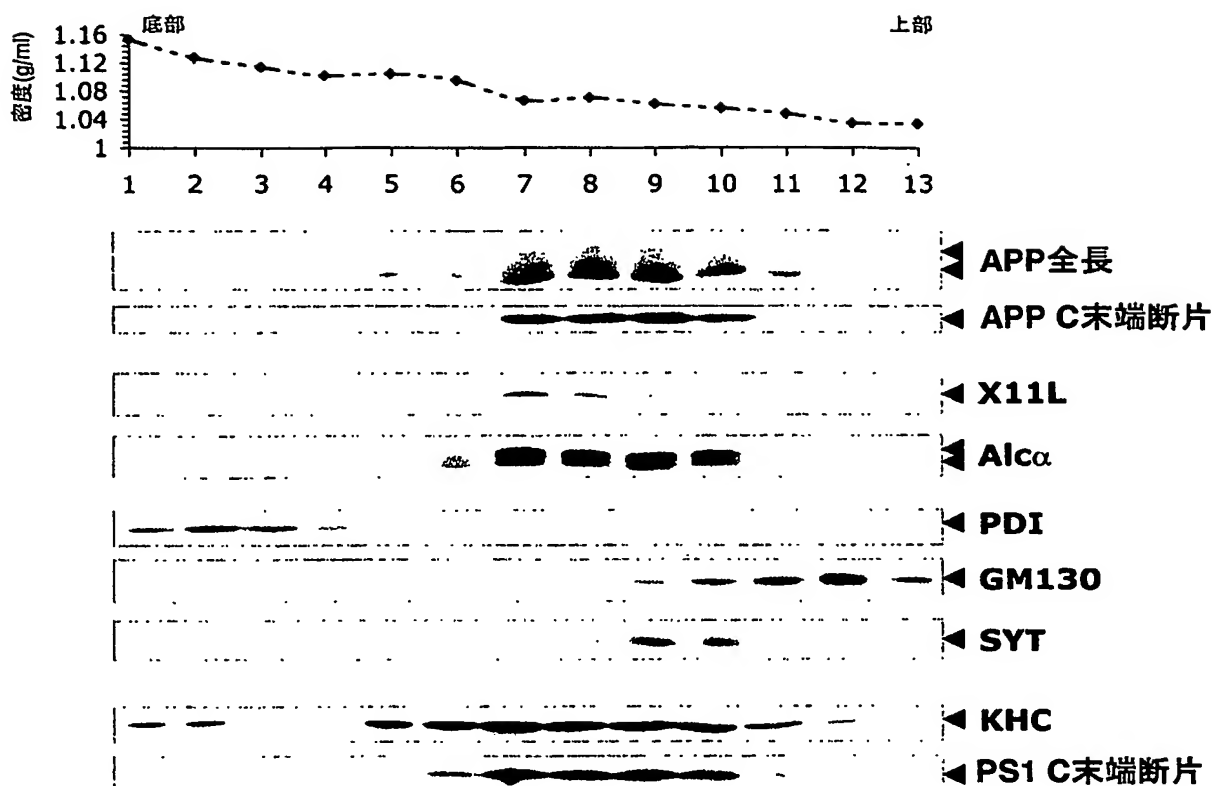
Met Ser Ser Ser Ser Gly Ser Asp Asp Ser Glu Glu Glu Glu Glu Glu  
915 920 925

Glu Gly Met Gly Arg Gly Arg His Gly Gln Asn Gly Ala Arg Gln Ala  
930 935 940

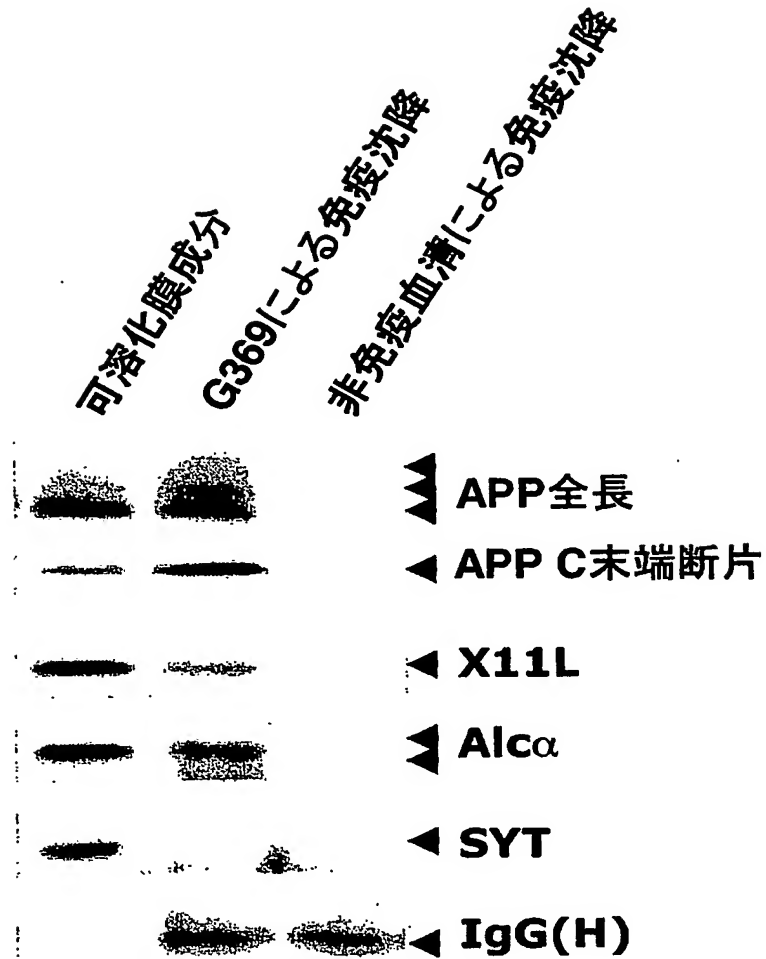
Gln Leu Glu Trp Asp Asp Ser Thr Leu Pro Tyr  
945 950 955

【書類名】 図面

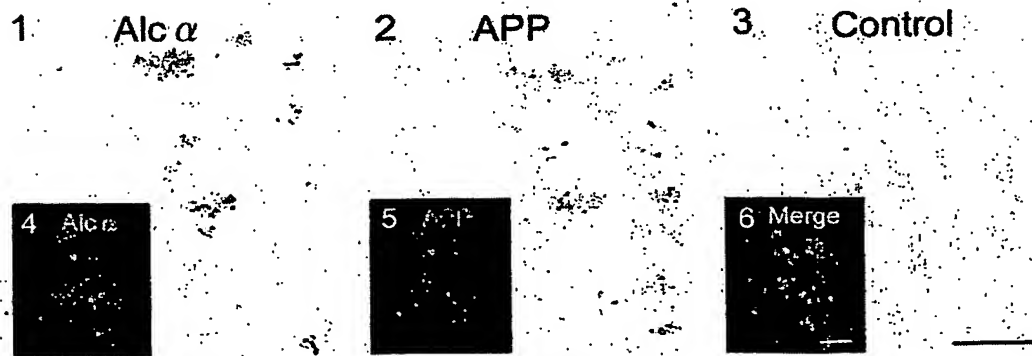
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【図 4】

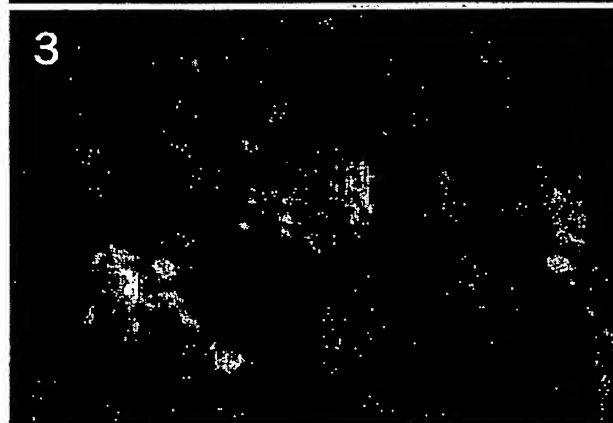
Alcα



Aβ

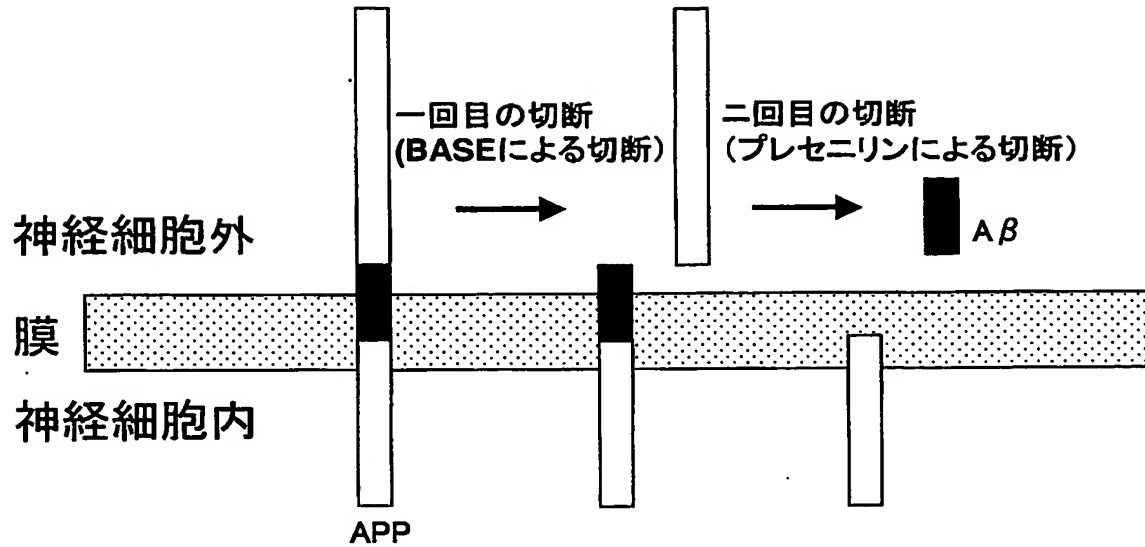


Merge

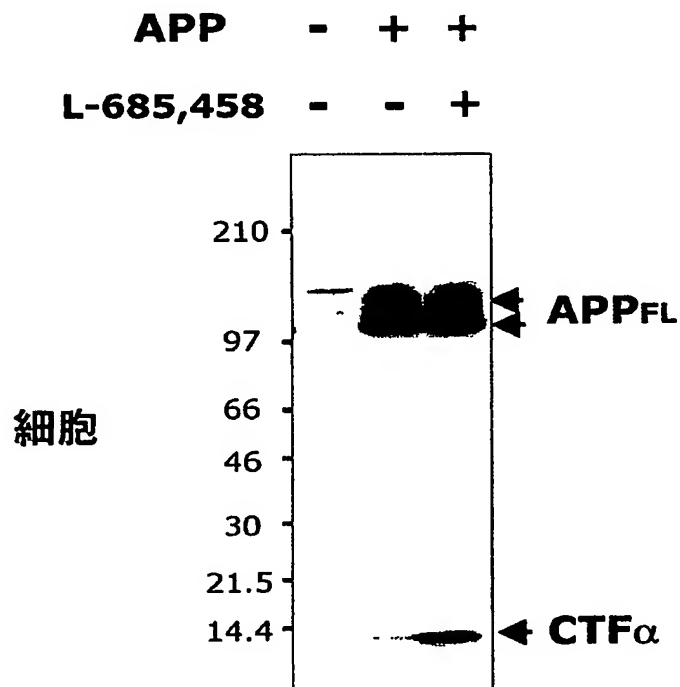


BEST AVAILABLE COPY

【図 5】

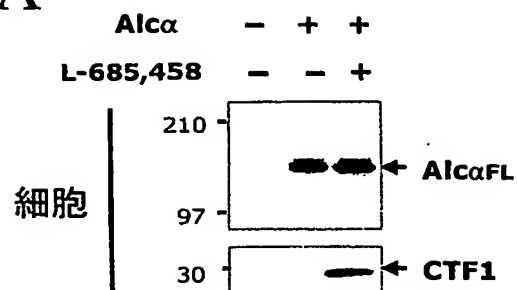


【図 6】

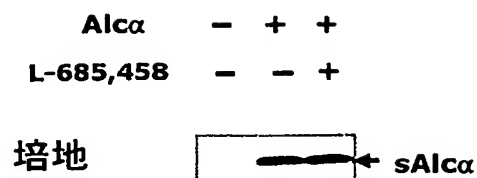


【図7】

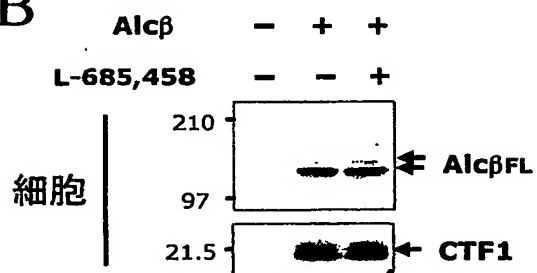
A



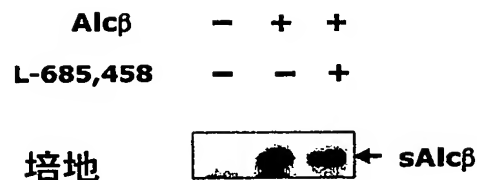
D



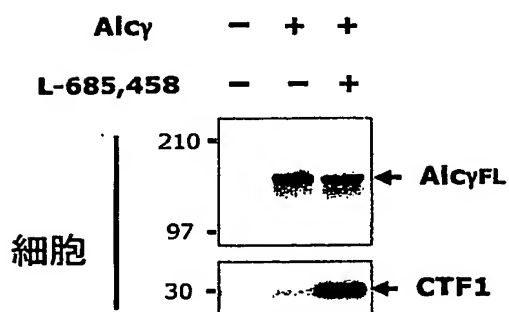
B



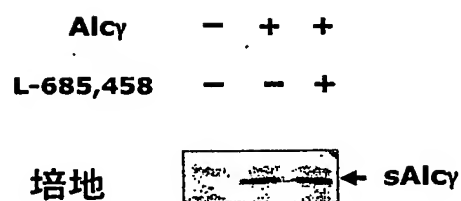
E



C



F

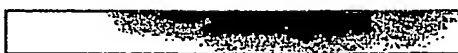




【図 8】

**A**

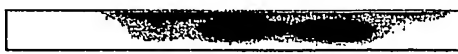
<b>Alc<math>\alpha</math></b>	-	+	+	+	+
<b>L-685,458</b>	-	-	-	-	+
<b>Incubate</b>	-	-	1h	3h	3h



← Alc $\alpha$ -ICD

**B**


<b>Alc<math>\beta</math></b>	-	+	+	+	+
<b>L-685,458</b>	-	-	-	-	+
<b>Incubate</b>	-	-	1h	3h	3h



← Alc $\beta$ -ICD

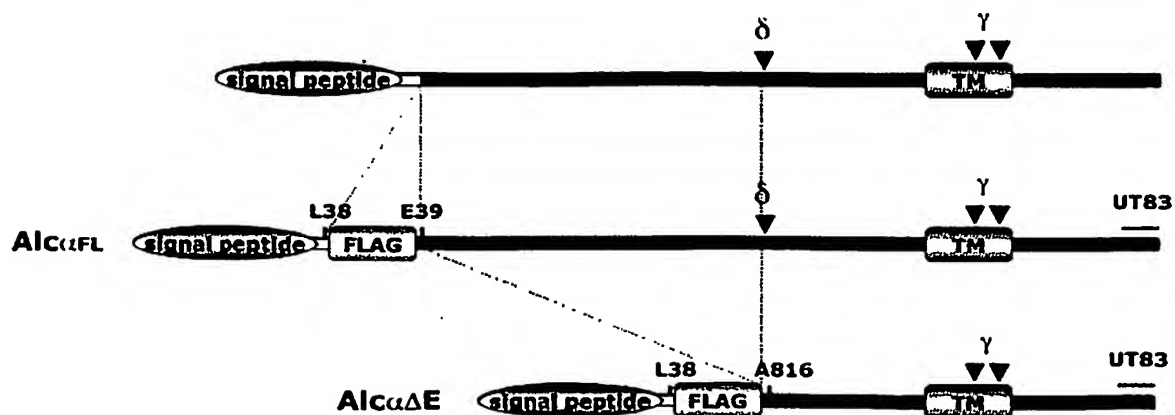
**C**

<b>Alc<math>\gamma</math></b>	-	+	+	+	+
<b>L-685,458</b>	-	-	-	-	+
<b>Incubate</b>	-	-	1h	3h	3h

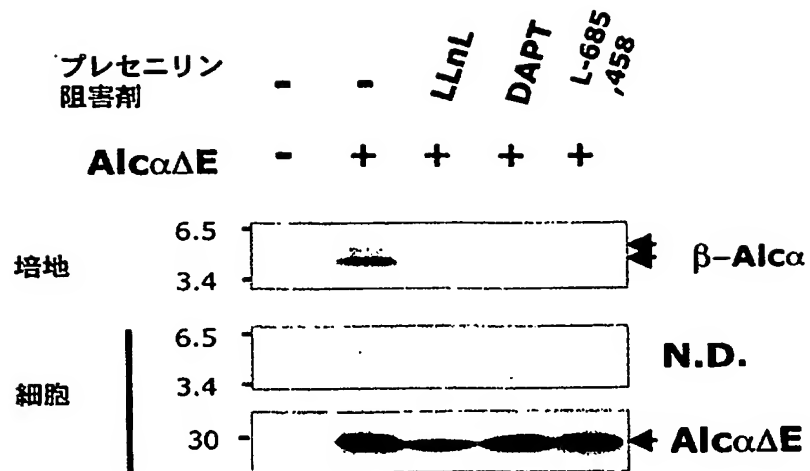


← Alc $\gamma$ -ICD

【図 9】



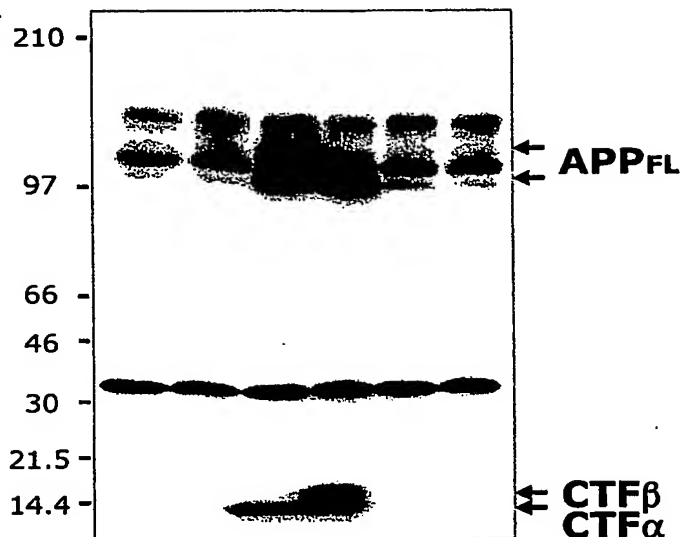
【図 10】



【図 11】

**A**

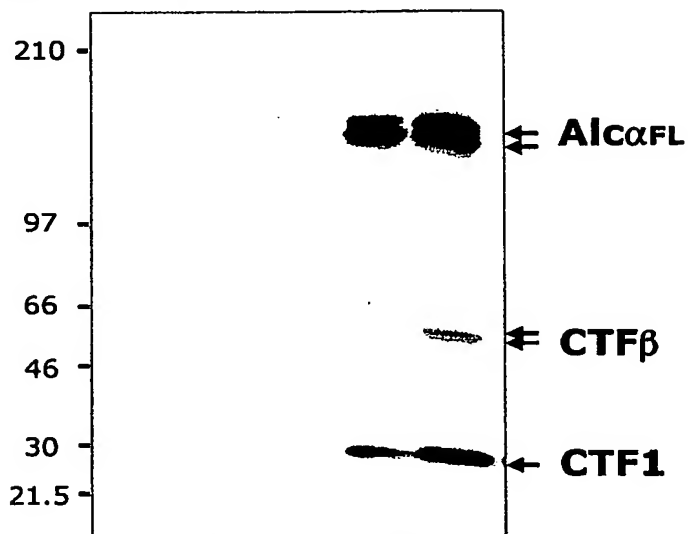
<b>APP</b>	-	-	+	+	-	-
<b>Aic<math>\alpha</math></b>	-	-	-	-	+	+
<b>BACE1</b>	-	+	-	+	-	+



BEST AVAILABLE COPY

**B**

<b>APP</b>	-	-	+	+	-	-
<b>Aic<math>\alpha</math></b>	-	-	-	-	+	+
<b>BACE1</b>	-	+	-	+	-	+



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 被検者に負担をかけず、初期段階でアルツハイマー病を発見できる手段を提供する。

【解決手段】 アルカディン $\alpha$ 、アルカディン $\beta$ 、又はアルカディン $\gamma$ からN末端側の断片とC末端側の断片が切断除去されることによって生成するペプチドであって、アルツハイマー病の診断マーカーとなり得るペプチド。

【選択図】 なし

特願 2003-375363

出願人履歴情報

識別番号 [501170910]

1. 変更年月日 2001年 4月27日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 北海道札幌市北区北8条西7丁目 中央第一公務員宿舎14-22  
氏 名 鈴木 利治
2. 変更年月日 2003年12月22日  
[変更理由] 住所変更  
住 所 千葉県千葉市中央区春日1-10-6-703  
氏 名 鈴木 利治